

RECD 20 AUG 2003

WIPO

PCT

대한민국 특허청
KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0038165
Application Number

출원년월일 : 2002년 07월 03일
Date of Application JUL 03, 2002

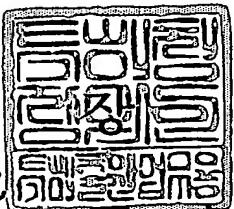
출원인 : (주)넥스젠
Applicant(s) NEXGEN

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003 년 08 월 01 일



특허청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.07.03
【발명의 명칭】	알부민 융합 단백질을 이용한 신규한 상피세포재생인자의 생산 방법
【발명의 영문명칭】	Method for Producing Novel Epidermal Growth Factor Using Albumin Fusion Protein
【출원인】	
【명칭】	(주)넥스젠
【출원인코드】	1-2000-021126-1
【대리인】	
【명칭】	특허법인 세신(대표변리사 최홍순, 김경철)
【대리인코드】	9-2001-100004-2
【지정된변리사】	최홍순, 김경철, 양부현
【포괄위임등록번호】	2001-064645-5
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이선교
【성명의 영문표기】	LEE, Sun
【주민등록번호】	580212-1010414
【우편번호】	305-390
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 세종아파트 108동 703호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	유제근
【성명의 영문표기】	Yoo, Jae Geun
【주민등록번호】	571007-1024114
【우편번호】	300-768
【주소】	대전광역시 동구 용전동 한숲아파트 112동 301호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박선희
【성명의 영문표기】	PARK, Sun Hee

【주민등록번호】 740823-2030219
【우편번호】 412-220
【주소】 경기도 고양시 덕양구 행신동 햇빛마을 2005동 206호
【국적】 KR
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
특허법인 세신(대표변리사 최홍순, 김경철) (인)
【수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 11 면 11,000 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 0 항 0 원
【합계】 40,000 원
【감면사유】 소기업 (70%감면)
【감면후 수수료】 12,000 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 소기업임을 증명하는 서류_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 단백질의 생산 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 알부민과의 융합 단백질을 이용한 인간 상피세포재생인자 (epidermal growth factor, EGF)의 생산 방법에 관한 것이다.

본 발명은 코돈을 최적화하여 합성한 인간 상피세포재생인자 유전자 및 알부민 유전자를 융합시켜 새로운 융합 유전자 상피세포재생인자 기능을 갖는 신규한 융합 단백질을 다양한 형질 전환체를 이용하여 생산함으로써 상피세포재생인자의 안정성을 증가시키고, 융합 단백질의 분리 및 정제가 쉽다.

【대표도】

도 6

【색인어】

인간 상피세포재생인자, 알부민, 융합 단백질, 식물 형질전환

【명세서】

【발명의 명칭】

알부민 융합 단백질을 이용한 신규한 상피세포재생인자의 생산 방법{Method for Producing Novel Epidermal Growth Factor Using Albumin Fusion Protein}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 알부민-EGF의 클로닝 과정을 도식화한 개념도;

도 2는 EGF-알부민의 클로닝 과정을 도식화한 개념도;

도 3은 알부민-EGf 또는 EGF-알부민 융합 유전자가 삽입된 재조합 플라스미드의 개념도;

도 4는 세포 파쇄 후 상등액의 단백질을 폴리아크릴아마이드 젤에 전기영동한 결과를 나타내는 사진;

도 5는 알부민-EGF 또는 EGF-알부민의 융합 단백질을 분리한 후 폴리아크릴아마이드 젤에 전기영동한 결과를 나타내는 사진;

도 6은 EGF 항체를 이용하여 융합 단백질을 확인한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타내는 사진;

도 7은 EGF-알부민 유전자 식물발현용 벡터의 개념도;

도 8은 각각의 형질전환 식물체에 대한 알부민-EGF의 융합 유전자의 PCR 산물을 아гар로스 젤에 전기영동한 결과를 나타내는 사진;

도 9는 각각의 형질전환 식물체에 대한 EGF-알부민의 융합 유전자의 PCR 산물을 아гар로스 젤에 전기영동한 결과를 나타내는 사진;

도 10은 알부민-EGF 또는 EGF-알부민의 융합 단백질을 분리한 후 폴리아크릴아마이드 젤에 전기영동한 결과를 나타내는 사진;

도 11은 EGF 항체를 이용하여 융합 단백질을 확인한 웨스턴 블로트 분석 결과를 나타내는 사진;

도 12는 본 발명의 신규한 인간 상피세포재생인자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<13> 본 발명은 단백질의 생산 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 알부민과의 융합 단백질을 이용한 인간 상피세포재생인자 (epidermal growth factor, EGF)의 생산 방법에 관한 것이다.

<14> 상피세포재생인자는 다음과 같은 다양한 기능이 있다. 예컨대, 당뇨병성 족부궤양, 육창 등의 궤양 부위에 상피세포재생인자를 도포함으로써 피부 재생을 도와 증세 악화로 인한 사지 절단을 막을 수 있으며, 난치성 만성 피부 궤양과 위궤양 등의 치료가 가능하다. 또한 상피세포재생인자는 각막 손상, 제왕절개 등의 수술 후 수술 부위의 피부 재생과 상흔을 최소화하는데 효과가 있으며, 화상 환자의 피부 재생을 촉진하고, 주름 개선과 피부 재생 촉진을 위한 노화 방지용 기능성 화장품의 원료로도 사용되고 있다.

<15> 이러한 상피세포재생인자의 생산을 위한 여러 시도들이 있었다.

<16> 첫째, 인간의 소변 등으로부터 직접 상피세포재생인자를 생산하려는 시도들(Gregory, 1975; Savage, 1981)이 있었으나, 이러한 방법은 정제 과정 중에 침전 및 농축 과정이 빈번하여 회수율이 낮고 대량 생산 공정에는 적합하지 못했다.

<17> 둘째, 인간 상피세포재생인자 유전자를 대장균 (Smith et al., 1982 및 Taniyama, 1986), 고초균 (Yamagata, 1989), 효모 (Urdea et al., 1983)에서 발현시켰으나 대장균에서 발현시킬 경우 세포 내에서 쉽게 단백질 분해 효소에 의하여 분해되어 유전자 발현율 및 수율이 낮고 순도가 높은 인간 상피세포재생인자를 얻기 위해서는 고속액체 크로마토그래피 컬럼을 사용하는 등 여러 공정 단계가 필요하여 가격이 매우 비싸지는 문제점이 있다.

<18> 이를 해결하기 위하여 단백질 분해효소로부터 보호하기 위해 상피세포재생인자를 세포 밖으로 분비시키는 발현 벡터를 이용하는 생산 방법을 보고하였는데 (대한민국 등록특허 제 102993 호), 상피세포재생인자가 세포 밖으로 분비되도록 형질전환된 대장균을 이용하여 기존의 내독소 문제나 세포 내 불순 단백질의 오염을 감소시켰으며 역상 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 1차 정제한 후, 음이온 교환수지를 이용하여 2차 정제하고, 최종단계로 방사 압축된 C18 컬럼을 이용한 역상 고속액체 크로마토그래피법을 이용하여 상피세포재생인자를 정제하였으나 복잡한 정제공정 등으로 인하여 생산가격 등이 문제가 될 수 있으며 제품화 시의 상피세포재생인자의 안정성이 문제가 될 수 있다. 그리고 융합 단백질을 이용한 상피세포재생인자의 생산에 관한 연구가 있었지만 융합 단백질의 생산 후 엔도펩티데이스로 융합 부위를 절단하여 상피세포재생인자만을 정제하는 번거로운 방법을 사용하고 있다.

<19> 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 특허 문현 및 논문이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 특허 문현 및 논문의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<20> 본 발명자들은 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 유전자 융합에 의하여 인간의 상피세포 재생인자를 융합 단백질의 형태로 식물체 내에서 생산하는 방법을 택하였으며 다음과 같은 특징들을 지닌 인체 유래의 혈청 단백질인 알부민을 융합파트너로 선택하여 사용하였다.

<21> 본 발명에서는 코돈을 최적화하여 합성한 인간 상피세포 재생인자 유전자 및 알부민 유전자를 융합시켜 새로운 융합 유전자 상피세포 재생인자 기능을 갖는 신규한 융합 단백질을 형질 전환체를 이용하여 생산함으로써 상피세포 재생인자의 안정성을 증가시켰다.

<22> 따라서, 본 발명의 목적은 안정하고 분리 및 정제가 용이한 인간 상피세포 재생인자의 생산 방법을 제공하는 것이다.

<23> 본 발명의 다른 목적은 알부민을 융합하여 발현 시 불안정한 웨타이드 또는 단백질에 안정성을 부여하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<4> 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 알부민 및 인간 상피세포 재생인자의 융합 유전자를 코딩하는 DNA 서열이 삽입된 융합 발현벡터로 형질 전환된 형질 전환체를 이용하여 인간 상피세포 재생인자를 생산하는 인간 상피세포 재생인자의 생산 방법을 제공한다.

<25> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 인간 상피세포재생인자의 유전자는 첨부 도면 도 12의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

<26> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 형질전환체는 미생물, 동물체, 식물체, 식물 세포 및 동물 세포 등으로 다양하며, 보다 바람직하게는 상기 형질전환체는 식물 형질전환체이다. 상기 식물 형질전환체는 아그로박테리움법을 이용하여 제작될 수 있으며, 다양한 종류, 예컨대, 참외, 오이, 수박, 유채, 담배 등의 형질전환체를 포함한다.

<27> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 펩타이드 또는 단백질에 알부민을 융합하여 발현 시 불안정한 펩타이드 또는 단백질에 안정성을 부여하는 안정성 부여 방법을 제공한다.

<28> 본 발명의 가장 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단백질은 인간 상피세포재생인자이다.

<29> 알부민은 인간 유래의 혈청 단백질로 정상인 혈장 단백질의 50-60%를 차지할 정도로 중요한 물질이며, 상당수의 산성 및 염기성 아미노산을 함유하고 있어 각종 양이온 음이온 및 기타 화합물과 강력한 친화성을 띤다. 이 친화성으로 인해 여러 종류의 대사 산물 또는 생체외 물질과 결합하여 산성증을 완화시키며 독성 물질을 중화시켜 완충 효과를 보이는 동시에 이들 물질의 운반을 담당한다. 즉, 본 발명에 사용한 혈청 알부민은 의약품 혈장 삼투압의 유지 기능, 운반 작용, 영양소로서의 작용 등을 하고 있는 인체 유래의 사용에 적용된다. 이러한 특징의 의약품으로는 혈장 대체제의 소재로 사용되고 있으며 화장품에 보습 및 영양분 공급제로 사용되고 있다. 이러한 장점들에 덧붙여 결정화시키기가 쉬워 순수한 형태로 분리가 쉽고 물에 쉽게 용해시킬 수 있는 알부민의 특징을 이용하여 알부민을 상피세포재생인자의 융합파트너로 사용하였다. 그러므로 융합 단백질의 생산 후에 융합 파트너의 절단 등이 필요 없이 융합 단백질 자체를 사용이 가능하도록 한 것을 특징으로 한다. 그 결과 융합 유전자를

도입시킨 숙주 생물에서 일부민과 상피세포재생인자의 융합 단백질을 안정하게 생산하여 분리 및 정제가 쉽고 안정한 신규한 상피세포재생인자를 생산하였다.

<30> 또한, 인간의 상피세포재생인자를 코딩하는 유전자는 기존에 밝혀진 상피세포재생인자의 아미노산 서열 (Gregory, 1975)에 근거하여 원핵 및 진핵세포 특히 식물세포에서 공통으로 적합한 코돈을 사용하였으며, 그 밖에 합성 시에도 문제가 없는 DNA 염기 서열을 고안하여 합성 제조하였다.

<31> 본 발명에서는 구조 단백질, 일부민을 코딩하는 유전자의 3' 쪽 말단 또는 5' 쪽 말단에 인프레임 (in frame)으로 인간 상피세포재생인자 유전자를 융합시키는 한편, 대장균에서의 발현을 위하여 pET28a (Novagen) 발현 벡터의 6개의 연속한 히스티딘 잔기의 유전자에도 인프레임이 되도록 발현 벡터에 삽입시켰다. 상기의 조작으로 융합 유전자를 택 프로모터 (*tac* promoter)와 락 I 억제 유전자 (*lac* I repressor)에 의하여 효과적으로 발현시켜 신규한 상피세포재생인자의 기능을 확인한다. 그리고 기능이 확인된 융합 단백질들의 식물체 또는 식물 세포에서의 생산을 위하여 해당 유전자들이 도입된 아그로박테리움 투머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101을 이용하여 식물 형질전환을 실시한다.

<32> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

▶ 실시예

<34> 실시예 1: 신규한 EGF 유전자의 합성

<35> 본 발명은 천연의 hEGF와 동일한 53개의 아미노산을 암호화하여 기존의 인간 상피세포재생인자(EGF)의 뉴클레오티드 서열을 최적의 코돈으로 대치하여 화학적으로 합성하여 인간 상피세포재생인자를 코딩하는 이중나선 DNA를 제조하였다. 상기 서열은 다음과 같다 (도 12 참조).

<36> 5'- atg aac agc gat tca gaa tgt cca ctg agc cat gac gga tac tgc ctg cac gac ggc gtc tgc
atg tac atc gag gca ctg gac aag tac gcg tgc aac tgt gtt gtt gga tac atc ggt gag cgt tgt
caa tac cgt gat ctt aag tgg tgg gaa ctg cgc tga-3'

<37> 실시예 2: 알부민-EGF 융합 유전자의 제작

<38> 알부민-EGF 융합유전자를 제작하고 pET28a 발현벡터에 도입하기 위하여 다음과 같은 과정의 실험을 수행하였다.

<39> EGF를 코딩하는 합성유전자가 제한효소 5'쪽 말단에 BamHI과 3'쪽 말단 HindIII의 인식부위를 가질 수 있도록 디자인한 한 쌍의 프라이머들을 사용하고 합성 EGF 유전자를 주형으로 하여 PCR을 실시한 후 획득한 PCR산물을 제한효소 BamHI과 HindIII로 처리한 후 추출하였다. 추출 정제된 EGF 유전자를 플라스미드 pUC18을 동일한 제한효소 BamHI과 HindIII로 절단한 것과 적절한 비율로 혼합하였다. 이 혼합물에 리게이션 버퍼와 T4 DNA 리가아제를 첨가한 후 1시간 실온에서 반응시켰다. 이 반응물을 CaCl_2 로 처리된 대장균 *E.coli* DH5a를 형질전환 시킨 후 앰피실린 (100 mg/mL)이 포함된 LB 배지에서 앰피실린 저항성을 지닌 균주를 선별하고

각 플라스미드 DNA를 분리하고 EGF 유전자가 삽입된 플라스미드를 확인하여 EGF/pUC18을 제조하였다 (도 1 및 도 3 참조).

<40> 인간 혈청단백질 알부민의 cDNA를 주형으로 하고 알부민 cDNA의 5'쪽 말단에 EcoRI과 3'쪽 말단 BamHI의 인식부위를 가질 수 있도록 디자인한 한 쌍의 프라이머들을 사용하여 PCR을 실시한 후 획득한 PCR산물을 제한효소 EcoRI과 BamHI으로 처리한 후 추출하였다. 추출 정제된 알부민 유전자를 EcoRI과 BamHI으로 절단한 EGF/pUC18 플라스미드와 적절한 비율로 혼합하였다. 그리고 위와 동일한 방법으로 리게이션하여 CaCl_2 로 처리된 대장균 *E.coli* DH5a를 형질전환 시킨 후 앰피실린 (100 mg/mL)이 포함된 LB 배지에서 앰피실린 저항성을 지닌 균주를 선별하고 각 플라스미드 DNA를 분리하고 알부민-EGF 융합유전자가 삽입된 플라스미드를 확인하여 알부민-EGF/pUC18을 제조하였다 (도 1 및 도 3 참조).

<41> 알부민-EGF의 융합유전자를 pET28a 발현벡터에 옮기기 위하여 알부민-EGF/pUC18을 제한효소 EcoRI과 HindIII로 절단한 후 전기영동을 실시하고 알부민-EGF의 융합유전자를 아가로스 젤에서 분리정제하였다. 이 알부민-EGF의 융합유전자를 동일한 제한효소 EcoRI과 HindIII로 절단한 pET28a와 혼합하여 위와 동일한 방법으로 ligation을 한 후 CaCl_2 로 처리된 대장균 *E.coli* BL21 (DE3)를 형질전환 시킨 후 가나마이신 (100 mg/mL)이 포함된 LB 배지에서 가나마이신 저항성을 지닌 균주를 선별하고 각 플라스미드 DNA를 분리하고 알부민-EGF 융합유전자가 삽입된 플라스미드를 확인하여 알부민-EGF/pET28a를 제조하였다 (도 1 및 도 3 참조).

<42> 구조유전자인 알부민과 상피세포재생인자의 유전자가 인프레임으로 융합된 것을 DNA 염기서열 분석에 의하여 확인하였다.

<43> 실시예 3: EGF-알부민 융합 유전자의 제작

<44> EGF-알부민 융합유전자를 제작하고 pET28a 발현벡터에 도입하기 위하여 다음과 같은 과정의 실험을 수행하였다.

<45> EGF를 코딩하는 합성유전자가 제한효소 5'쪽 말단에 EcoRI과 3'쪽 말단 BamHI의 인식부위를 가질 수 있도록 디자인한 한 쌍의 프라이머들을 사용하고 합성 EGF 유전자를 주형으로 하여 PCR을 실시한 후 획득한 PCR산물을 제한효소 EcoRI과 BamHI으로 처리한 후 추출하였다. 추출 정제된 EGF 유전자를 플라스미드 pUC18을 동일한 제한효소 EcoRI과 BamHI로 절단한 것과 적절한 비율로 혼합하였다. 그리고 실시예 2와 동일한 방법으로 대장균 E.coli DH5a를 형질전환 시킨 후 앰피실린(100 mg/mL)이 포함된 LB 배지에서 앰피실린 저항성을 지닌 균주를 선별하고 각 플라스미드 DNA를 분리하고 EGF 유전자가 삽입된 플라스미드를 확인하여 EGF/pUC18을 제조하였다 (도 2 및 도 3 참조).

<46> 인간 혈청단백질 알부민의 cDNA를 주형으로 하고 알부민 cDNA의 5'쪽 말단에 BamHI과 3'쪽 말단 HindIII의 인식부위를 가질 수 있도록 디자인한 한 쌍의 프라이머들을 사용하여 PCR을 실시한 후 획득한 PCR산물을 제한효소 BamHI과 HindIII으로 처리한 후 추출하였다. 추출 정제된 알부민 유전자를 BamHI과 HindIII으로 절단한 EGF/pUC18 플라스미드와 적절한 비율로 혼합하였다. 그리고 실시예 2와 동일한 방법으로 대장균 E.coli DH5a를 형질전환 시킨 후 앰피실린(100 mg/mL)이 포함된 LB 배지에서 앰피실린 저항성을 지닌 균주를 선별하고 각 플라스미드 DNA를 분리하고 EGF-알부민 융합유전자가 삽입된 플라스미드를 확인하여 EGF-알부민/pUC18을 제조하였다 (도 2 및 도 3 참조).

<47> EGF-알부민의 융합유전자를 pET28a 발현벡터에 옮기기 위하여 EGF-알부민/pUC18을 제한효소 EcoRI과 HindIII로 절단한 후 전기영동을 실시하고 EGF-알부민의 융합유전자를 아가로스

젤에서 분리정제 하였다. 이 EGF-알부민의 융합유전자를 동일한 제한효소 EcoRI과 HindIII로 절단한 pET28a와 혼합하여 위와 동일한 방법으로 ligation을 한 후 CaCl₂로 처리된 대장균 *E.coli* BL21 (DE3)를 형질전환 시킨 후 가나마이신(100 mg/mL)이 포함된 LB 배지에서 가나마이신 저항성을 지닌 균주를 선별하고 각 플라스미드 DNA를 분리하고 EGF-알부민 융합유전자가 삽입된 플라스미드를 확인하여 EGF-알부민/pET28a를 제조하였다 (도 2 및 도 3 참조).

<48> 구조유전자인 알부민과 상피세포재생인자의 유전자가 인프레임으로 융합된 것을 DNA 염기서열 분석에 의하여 확인하였다.

<49> 실시예 4: 융합 단백질의 함유 분획 확인

<50> 플라스미드 알부민-EGF/pET28a 또는 EGF-알부민/pET28a를 5L 발효조에서 OD₆₅₀ 0.5가 될 때까지 배양한 후 IPTG(0.5mM)를 가하여 클론된 유전자들의 발현을 유도하였다. 5-6시간 더 배양한 후 세포들을 원심분리방법으로 회수하였다. 이 세포들을 40mL의 완충용액(50mM Tris, pH8.0, 1mMEDTA)에 완전히 혼탁시킨 후 초음파파쇄기를 사용하여 세포를 파괴한 다음 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 이 용액을 8% 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동법으로 induction 유무에 따른 융합단백질 발현차이를 확인하였다 (도 4 참조).

<51> 이 상등액을 결합용 완충용액 (20 mM phosphate, 0.5M NaCl, 10mM imidazole)으로 활성화시킨 니켈-아가로스 컬럼에 가하고 1-3mL/min의 속도로 통과시킨 다음, 다시 결합용 완충용액으로 컬럼을 수회 세척한 후 20, 40, 60, 100, 300, 500mM 이미다졸 용액 (pH7.4)을 각각 컬럼에 적용하여 융합 단백질을 컬럼에서 1mL씩 분획 용출시켜 순수하게 분리 및 정제하였다.

분획 용액을 각각 시료로 하여 8% 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동법으로 정제된 융합 단백질 함유 분획을 확인하였다 (도 5 참조).

<52> 실시예 5: 융합 단백질의 확인

<53> 상기 실시예 4에서 융합 단백질의 존재가 확인된 분획에서 시료를 택하여 폴리아크리아마이드 젤 전기영동을 하여 나타난 단백질 랜드를 PVDF 막에 전이한 후, 단백질이 전이된 PVDF 막에 1차 항체 (anti EGF-rabbit, 1:1000희석)를 가하여 1시간 배양하였다. 배양 후 막을 세척한 후 2차 항체 (rabbit-goat HRP, 1:1000희석)를 가하고 다시 1시간 배양을 하고 막을 세척하였다. 항체의 부착이 완결된 후 4-클로로-1-나프톨을 기질로 하여 발색 반응을 실시하여 EGF가 융합된 단백질의 예상 크기에의 발색 랜드를 조사하여 EGF의 융합 단백질의 존재를 확인하였다 (도 6 참조).

<54> 실시예 6: 알부민-EGF 융합 유전자의 식물 발현용 벡터의 제작

<55> 알부민-EGF 융합 유전자를 PCR 기법을 이용하여 바이너리 벡터 pRD400의 식물 발현용 카세트에 서브클로닝하기 위하여 본 발명에 사용된 알부민과 EGF의 유전자 염기배열을 참고로 하여 디자인한 두 개의 올리고뉴클레오파이드를 합성하였다. 알부민 유전자의 5'-말단에 위치하는 정방향 프라이머가 NheI 제한효소부위와 알부민 유전자의 시작 코돈을 갖도록 하며 (5'-CTAGCTAGCGATGAAGTGGGTAACCTTAT-3'), 3'-말단에 위치하는 역방향 프라이머는 PCR 후 PCR 산물에 EGF 유전자의 종결 코돈과 제한효소부위 NheI이 생성되도록 (5'-CTAGCTAGCCGCAGTCCCCACCACTTAAGA-3') 디자인하였다. PCR 시료조성은 1.25 unit Taq DNA

증합효소 (BM), 2.5 μ l 10x buffer, 2 μ l 2.5 mM dNTP, 0.25 μ l 100 pM primers, 50ng gad 유전자를 포함하는 DNA 총 25 μ l로 수행하였다. PCR은 95°C에서 전-변성 2분, 55°C에서 프라이머의 어닐링 1분, 72°C에서 신장 1분, 92°C에서 변성 1분, 72°C에서 후-신장 10분의 조건으로 30회 반응시켰다 (MJ Research, Inc. MinicycleTM). PCR후 시료를 분석하기 위하여 4°C로 유지하였고 0.8% TAE 아가로스 젤에 전기영동을 한 후 상응하는 크기의 밴드를 일루션하여 원하는 gad DNA 단편을 회수하였다. 정제한 일부민-EGF 유전자 단편을 제한효소 NheI으로 절단한 후 제한효소 XbaI으로 절단한 식물 발현용 바이너리벡터 pRD400에 도입하여 일부민-EGF 유전자 식물발현용 벡터를 제작하였다 (도 7 참조).

<56> 실시예 7: EGF-알부민 융합 유전자의 식물 발현용 벡터의 제작

<57> EGF-알부민 융합 유전자를 PCR기법을 이용하여 바이너리 벡터 pRD400의 식물 발현용 카세트에 서브크로닝하기 위하여 본 발명에 사용된 일부민과 EGF의 유전자 염기배열을 참고로 하여 디자인한 두개의 올리고뉴클레오타이드를 합성하였다. EGF 유전자의 5'-말단에 위치하는 정방향 프라이머가 NheI 제한효소부위와 EGF 유전자의 시작 코돈을 갖도록 하며 (5'-CTAGCTAGCGATGAACAGCGATTCAAATG-3'), 3'-말단에 위치하는 역방향 프라이머는 PCR 후 PCR 산물에 일부민 유전자의 종결 코돈과 제한효소부위 NheI이 생성되도록 (5'-CTAGCTAGCCGGTACCGCGTAGAATCGAGA-3') 디자인하였다. 실시예 6과 동일하게 실시하여 확보한 정제된 EGF-알부민 유전자 단편을 제한효소 NheI으로 절단한 후 제한효소 XbaI으로 절단한 식물발현용 바이너리벡터 pRD400에 도입하여 도 8과 같이 EGF-알부민 유전자 식물 발현용 벡터를 제작하였다.

<58> 실시예 8: 식물 형질전환

<59> 실시예 8-1: 아그로박테리움 투머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101의 감염

<60> 실시예 6의 pRD400::(알부민-EGF)와 실시예 7의 pRD400::(EGF-알부민)를 접합 (conjugation)에 의하여 각각 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (mp90); Plant-cell-rep. 15(11): 799-803(1996))로 도입시켰다. 유전자가 도입된 아그로박테리움을 선발하기 위하여 접합을 실시한 혼합액을 50 mg/L 가나마이신, 30 mg/L 겐타마이신이 첨가된 LB 고체배지에 도말한 후 28°C에서 2일 배양한 후 선별하였다. 선발된 유전자를 지닌 아그로박테리움을 슈퍼브로스 (BHI 배지, pH 5.6)에 접종한 후 28°C에서 2일간 배양한 후 식물체의 감염에 사용하였다.

<61> 실시예 8-2: 참외 형질전환

<62> 소독한 참외 종자를 파종하여 확보한 자엽을 생장점이 완전히 배제되도록 자엽을 채취하였다. 한편, pRD400::(알부민-EGF) 또는 pRD400::(EGF-알부민)에 의해 형질전환된 아그로박테리움 투머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Mp90); Plant-cell-rep. 15(11):799-803(1996))를 100 μ M 아세토시린곤 (acetosyringone)이 함유된 슈퍼 브로스 (Super broth: 37 g/L Brain heart infusion broth(Difco) 및 0.2% 수크로스 (pH 5.6)에서 18 시간 동안 28°C에서 배양한 다음, 배양액을 감염 배지를 이용하여 20배로 희석하였다. 상기 감염 배지 (pH 5.6)는 MSB5 (Murashige & Skoog medium including Gamborg B5 vitamins), 3.0% 수크로스, 0.5 g/L MES [2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid Monohydrate], 6.0 mg/L 키

네틴, 1.5 mg/L IAA (Indole-3-acetic acid), 1.0 mg/L CuSO₄ · 5H₂O, 100 μM 아세토시린곤 및 5% DMSO (dimethylsulfoxide)를 포함한다.

<63> 이어, 상기 자엽을 감염 배지 40 mL에 침지시키고 20분 동안 배양하 후, 자엽을 공동배양 배지 (MSB5, 3.0% 수크로스, 0.5 g/L MES, 6.0 mg/L 키네틴, 1.5 mg/L IAA, 1.0 mg/L CuSO₄ · 5H₂O, 0.6% 아가, 100 μM 아세토시린곤 및 5% DMSO)로 옮겼다. 암배양 조건 (26 °C, 24시간 night)으로 3일 동안 공동 배양 후, 자엽을 선발 배지 (MSB5, 3.0% 수크로스, 0.5 g/L MES, 6.0 mg/L 키네틴, 1.5 mg/L IAA, 1.0 mg/L CuSO₄ · 5H₂O, 0.6% 아가, pH5.6, 100 mg/L 카나마이신 및 500 mg/L 카르베니실린)에 치상하고, 26°C 온도와 4,000 Lux 조도에서 16시간 광조건에서 3주 동안 광배양 하여 신초의 발생을 유도하였다. 신장된 신초를 발근 배지 (MSB5, 3.0% 수크로스, 0.5 g/L MES, 0.1 mg/L NAA (α-Naphthalene Acetic Acid), 1.0 mg/L CuSO₄ · 5H₂O, 0.6% 아가, pH5.6, 100 mg/L 카나마이신 및 500 mg/L 카르베니실린)에 이식하여 2주일 동안 배양하고, 형질전환된 것으로 추정되는 발근된 신초를 선별하였다.

<64> 실시예 8-3: 오이 형질전환

<65> 소독한 오이 종자를 파종하여 확보한 자엽을 생장점이 완전히 배제되도록 자엽을 채취하였다. 한편, pRD400::(알부민-EGF) 또는 pRD400::(EGF-알부민)에 의해 형질전환된 아그로박테리움 투머파시엔스를 상기의 실시예 8-1과 같은 조건으로 배양하고 상기 오이 자엽 절편을 상기의 실시예 8-2의 참외 형질전환과 동일한 방법으로 조제한 감염배지에 각각의 아그로박테리움을 혼합한 감염용액에 침지시켜 10분 동안 혼합하였다.

<66> 그런 다음, 2일 동안 26°C에서 광배양 조건으로 공동배양 배지 (BAP 2mg/L, NAA 0.01mg/L가 함유된 MSB5에서 광배양한 다음 저온 (4°C)에서 4일 동안 아그로박테리움 투머페이션스 및 자엽을 공동배양하였다. 그 후, 자엽을 MS-B5, MES 0.5g/L, 3% sucrose, 0.4%Phytigel을 기본으로 하는 선발 배지에 BAP 2 mg/L, NAA 0.01 mg/L, 카르베니실린 500 mg/L, 카나마이신 100mg/L을 추가하여 4주 동안 26°C 및 8,000 Lux, 16시간/8시간 (광/암)의 조건에서 배양하였다. 이어, 재분화된 신초를 일정량의 NAA 0.01 mg/L, 카나마이신 100 mg/L 및 일정량의 아가 0.4%를 포함하는 발근 배지에 옮겨 26°C 및 8,000 Lux, 16시간/8시간 (광/암)의 조건으로 배양하여 발근한 개체를 형질전환체로 추정하여 하기 실시예 7의 방법을 이용하여 분석하였다.

<67> 실시예 8-4: 수박 형질전환

<68> 소독한 수박 종자를 파종하여 확보한 자엽을 생장점이 완전히 배제되도록 자엽을 채취하였다. 한편, pRD400::(알부민-EGF) 또는 pRD400::(EGF-알부민)에 의해 형질전환된 아그로박테리움 투머파시엔스를 상기의 실시예 8-1과 같은 조건으로 배양하고 상기 오이 자엽 절편을 상기의 실시예 8-2의 참외 형질전환과 동일한 방법으로 조제한 감염배지에 각각의 아그로박테리움을 혼합한 감염용액에 침지시켜 10분 동안 혼합하였다. 그런 다음, BAP 2 mg/L가 함유된 공동 배양배지(4.04 g/L MSB5, 3.0% Sucrose, 0.5 g/L MES, 0.6% agar, pH 5.6)에 치상하고, 4000 Lux로 16시간의 광배양 조건에서 2일간 25°C 쿠°C로 배양하였다. 배양한 자엽은 배지 (MSB5, BAP 2 mg/L, 3.0% Sucrose, 0.5 g/L MES, 0.4% phytigel, pH 5.6, 카베니실린 500 mg/L, 카나마이신 200 mg/L)에 치상 후 7일간 25°C 쿠°C에서 4주간 배양하여 신초를 선발하였다.

<69> 실시예 8-5: 유채 형질전환

<70> 소독한 유채 종자를 파종하여 확보한 자엽을 생장점이 완전히 배제되도록 엽병을 채취하였다. 한편, pRD400::(알부민-EGF) 또는 pRD400::(EGF-알부민)에 의해 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스를 상기의 실시예 8-1과 같은 조건으로 배양하고 상기 유채 엽병을 상기의 실시예 8-2의 참외 형질전환과 동일한 방법으로 조제한 감염배지에 각각의 아그로바테리움을 혼합한 감염용액에 침지시켜 10분 동안 혼합하였다. 그런 다음 공동 배지 (MSB5, 3% sucrose, 1 mg/L 2,4-D, 6.5 g/L agar power, pH 5.8)에 25°C에서 2일 배양한 후 4°C에서 4일 배양하였다. 형질전환된 유채를 선별하기 위하여 선발 배지 (MSB5, 3% sucrose, 5 g/L MES, 2 mg/L BA, 0.01 mg/L NAA, 20 mg/L kanamycin, 500 mg/L Pseudopen, 6.5 g/L agar power, pH 5.8)으로 옮긴 후 2주 동안 25°C, 16h 명/ 8h 암 조건에서 배양하였다. 2주 이후 성장한 신초의 뿌리를 유도하기 위하여 MSB5, 3% sucrose, 5 g/L MES, 0.1 mg/L NAA, 20 mg/L kanamycin, 500 mg/L Pseudopen, 6.5 g/L agar, pH 5.8 인 배지로 옮긴 후 뿌리를 유도하였다.

<71> 실시예 8-6: 담배 형질전환

<72> 소독한 담배 종자를 파종하여 2주 이상 무균 배양한 신선하고 어린 담배잎을 채취하였다. pRD400::(알부민-EGF) 또는 pRD400::(EGF-알부민)에 의해 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스를 상기의 실시예 8-1과 같이 배양하여 상기의 실시예 8-2의 참외 형질전환과 동일한 방법으로 조제한 감염배지에 혼합하였다. 이 감염 용액에 채추한 담배잎을 0.5-1cm² 의 크기로 절단하여 10-15분 동안 침지시킨 후, 공동배양 배지 (MSB5, 3.0%

수크로스, 0.5 g/LMES, 1.0 mg/L BAP, 0.1 mg/L NAA, pH5.8, 0.6% 아가)로 옮겼다. 암배양 조건 (26 °C, 24시간 night)으로 2일 동안 공동배양 후, 잎 절편을 선발 배지 (MSB5, 3.0% 수크로스, 0.5 g/LMES, 1.0 mg/L BAP, 0.1 mg/L NAA, 0.6% 아가, pH5.6, 100 mg/L 카나마이신 및 500 mg/L카르베니실린)에 치상하고, 26°C 온도와 4,000 Lux 조도에서 16시간 광조건에서 2주 동안 광배양 하여 신초의 발생을 유도하였다. 신장된 신초를 발근 배지(MSB5, 3.0% 수크로스, 0.5 g/LMES, 0.01 mg/L NAA, 0.6% 아가, pH5.6, 100 mg/L카나마이신 및 500 mg/L 카르베니실린)에 이식하여 2주일 동안 배양하며 형질전환된 것으로 추정되는 발근된 신초를 선별하였다.

<73> 실시예 9: 형질전환체의 확인

<74> 상기 실시예 8에서 확보한 형질전환체의 확인은 다음과 같이 실시하였다.

<75> 선발 배지에서 형질전환체로 선발된 신초 10 mg으로부터 에드워드 (Edwards) 방법 (*Nucleic Acids Research*, 19:1349(1991))을 사용하여 식물 지놈 DNA를 분리한 후, 이를 주형 DNA로 하여 PCR 분석을 실시하였다.

<76> 알부민-EGF의 형질전환 식물체의 PCR 분석에서 사용된 프라이머는 Albumin+EGF 유전자의 염기 서열에 대응하는 것으로서, 전방향 프라이머는 5'-CTAGCTAGCGATGAAGTGGGTAACCTTAT-3' 이고, 역방향 프라이머는 5'-CTAGCTAGCCGCAGTTCCCACCACTTAAGA-3' 이다.

<77> EGF-알부민의 형질전환 식물체의 PCR 분석에서 사용된 프라이머는 EGF+Albumin 유전자의 염기 서열에 대응하는 것으로서, 전방향 프라이머는 5'-CTAGCTAGCGATGAACAGCGATTAGAATG-3' 이고, 역방향 프라이머는 5'-CTAGCTAGCCCCGGTACGCGTAGAATCGAGA-3' 이다.

<78> PCR 반응은 Taq 중합효소를 이용하여, 96°C에서 2분간 전-변성한 후, 94°C에서 1분간 변성, 55°C에서 1분간 어닐링, 72°C에서 2분간의 중합 반응을 35회 반복하였고, 추가로 72°C에서 10분간 연장 반응을 하였고, 반응 산물은 1.0% 아가로스 젤에서 분석하였다 (도 8 및 도 9 참조).

<79> 도 8에서 M 레인은 1 kb 레더이고, 1 레인은 유전자를 포함하는 양성표준 플라스미드 pRD400::(알부민-EGF)의 PCR 산물이며, 2,4,6,8 및 10 레인은 각각 야생종 담배, 참외, 오이, 수박의 염색체 DNA를 주형으로 한 PCR 산물이며, 3,5,7,9 및 11 레인은 각각 선발된 담배, 참외, 오이, 수박 형질 전환체의 DNA를 주형으로 한 PCR 산물들을 로딩하였다.

<80> 도 9에서 M 레인은 1 kb 레더이고, 1 레인은 유전자를 포함하는 양성표준 플라스미드 pRD400::(EGF-알부민)의 PCR 산물이며, 2,4,6,8 및 10 레인은 각각 야생종 담배, 참외, 오이, 수박의 염색체 DNA를 주형으로 한 PCR 산물이며, 3,5,7,9 및 11 레인은 각각 선발된 담배, 참외, 오이, 수박 형질전환체의 DNA를 주형으로 한 PCR 산물들을 로딩하였다.

<81> 실시예 10: 융합 단백질의 함유 분획 확인

<82> 형질전환 식물체의 잎 1g을 잘라서 막자사발에 넣고 미리 제조한 2.5mL 추출완충액 (5mL 100mM Tris-Cl, pH 7.5, 40 500mM EDTA, pH 8.0, 1.5mL 1mg/mL leupeptin, 600 μL 5mg/mL BSA, 3mL 1mg/mL DTT, 사용직전에 30mg/mL *PMSF(stock ; 0.003g PMSF in 10 μL IPA) 50 μL를 첨가)를 가하여 미세하게 갈았다. 추출액을 12,000rpm, 4°C에서 30분 이상 원심 분리한 후 상층액을 취하여 새 투브로 옮기고 얼음에 보관하였다.

<83> 브래드포드 (Bradford)의 방법에 의해 상기의 식물 추출액에 염색제 (protein assay kit, Bio-Rad)를 넣고 UV-분광광도계로 595 nm에서 흡광도를 측정하고 bovine serum albumin standard와 비교해서 형질전환 식물체의 단백질 정량을 실시하였다. 이 상등액을 단백질의 양이 동일하도록 조정하여 각각 시료로 하여 8% 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동법으로 정제된 융합 단백질 함유 분획을 확인하였다 (도 10 참조).

<84> 융합 단백질의 존재가 확인된 시료를 택하여 폴리아크리아마이드 젤 전기영동을 하여 나타난 단백질 밴드를 PVDF 막에 전이한 후, 단백질이 전이된 PVDF 막에 1차 항체 (anti EGF-rabbit, 1:1000희석)를 가하여 1시간 배양을 하였다. 배양 후 막을 세척한 후 2차 항체 (rabbit-goat HRP, 1:1000희석)를 가하고 다시 1시간 배양을 하고 막을 세척한다. 항체의 부착이 완결된 후 4-클로로-1-나프톨을 기질로 하여 발색 반응을 실시하여 EGF가 융합된 단백질의 예상 크기에의 발색밴드를 조사하여 EGF의 융합단백질의 존재를 확인하였다 (도 11 참조).

<85> 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【발명의 효과】

<86> 본 발명은 코돈을 최적화하여 합성한 인간 상피세포재생인자 유전자 및 일부 민 유전자를 융합시켜 새로운 융합 유전자 상피세포재생인자 기능을 갖는 신규한 융합 단백질을 다양한 형

질 전환체를 이용하여 생산함으로써 상피세포재생인자의 안정성을 증가시키고, 융합 단백질의 분리 및 정제가 쉽다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

알부민 및 인간 상피세포재생인자의 융합 유전자를 코딩하는 DNA 서열이 삽입된 융합 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 이용하여 인간 상피세포재생인자를 생산하는 인간 상피세포재생인자의 생산 방법.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서 상기 인간 상피세포재생인자의 유전자는 도 12의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 상피세포재생인자의 생산 방법.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서, 상기 형질전환체는 식물 형질전환체인 것을 특징으로 하는 인간 상피세포재생인자의 생산 방법.

【청구항 4】

펩타이드 또는 단백질에 알부민을 융합하여 발현 시 불안정한 펩타이드 또는 단백질에 안정성을 부여하는 안정성 부여 방법.

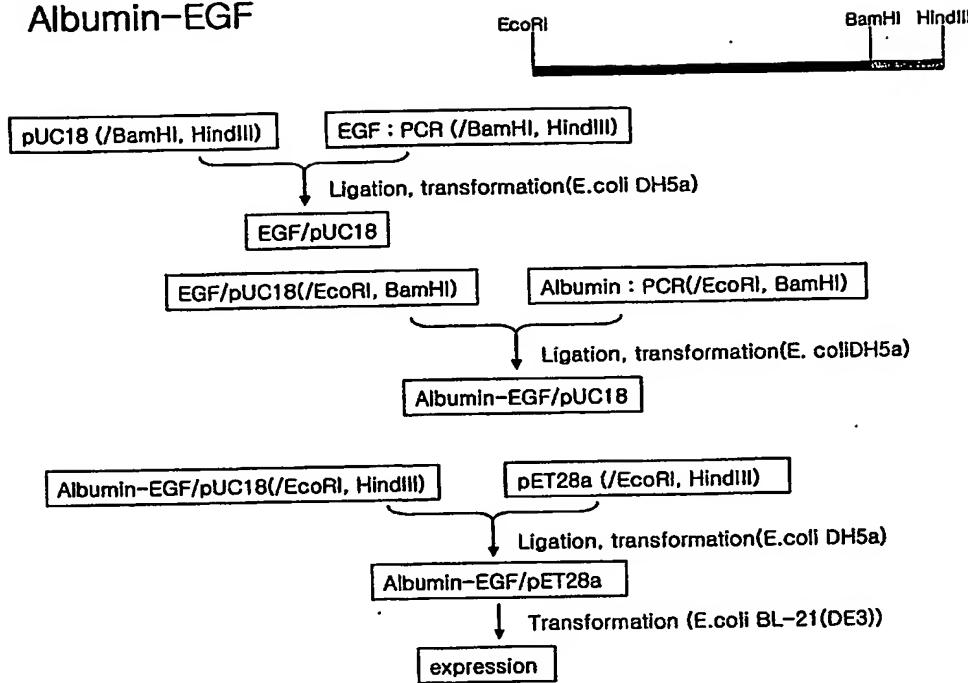
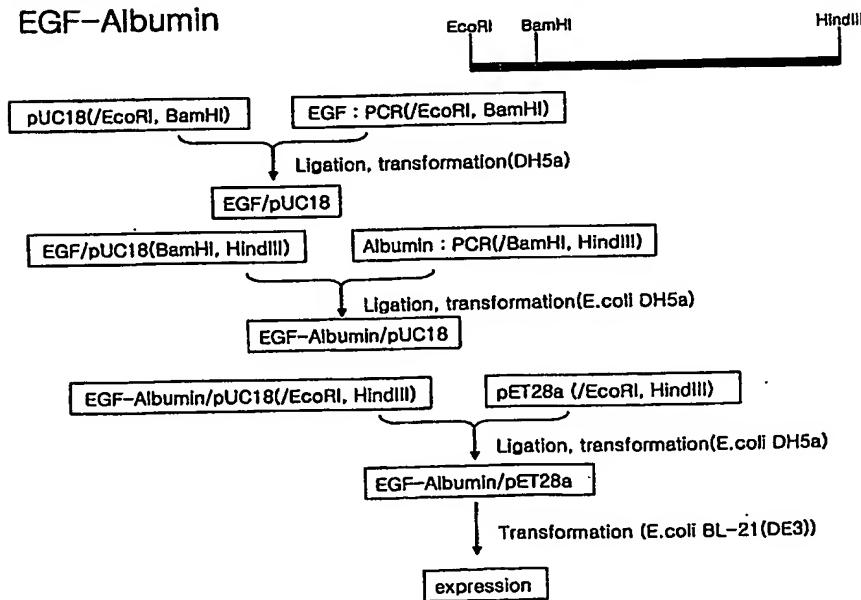
102 38165

출력 일자: 2003/8/8

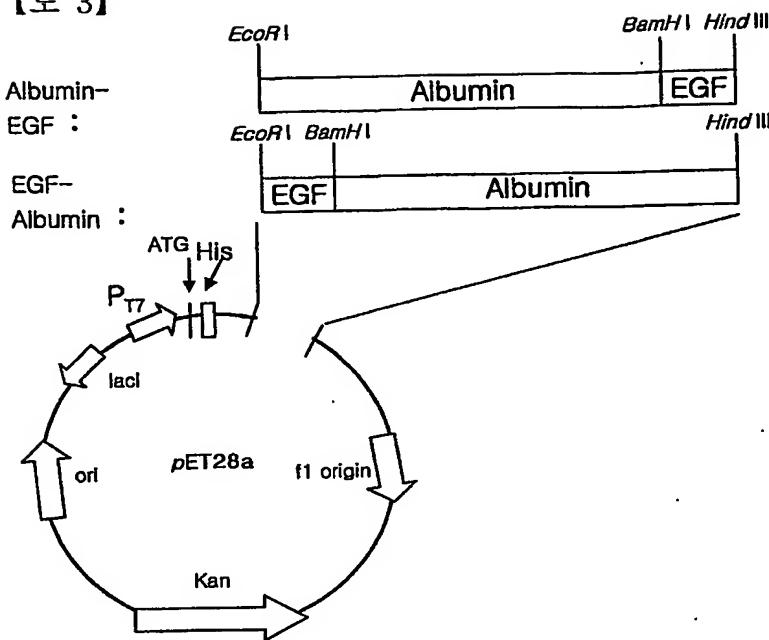
【청구항 5】

제 4 항에 있어서, 상기 단백질은 인간 상피세포재생인자인 것을 특징으로 하는 안정성
부여 방법.

【도면】

【도 1】
Albumin-EGF【도 2】
EGF-Albumin

【도 3】

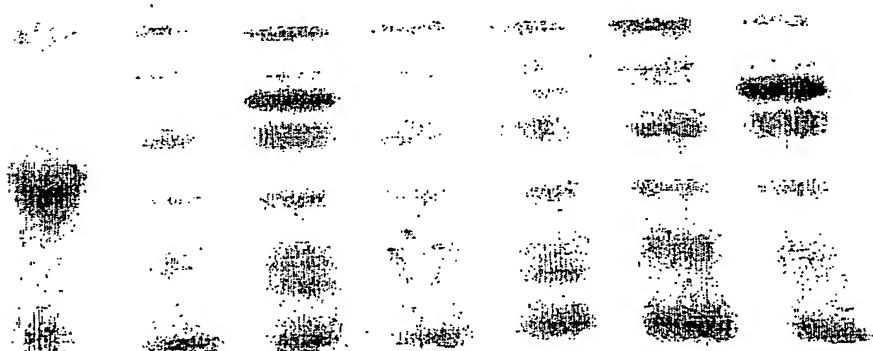


【도 4】

M A-E pET28a E-A

Induction

- + - + - +



M: Protein size marker

A-E: 알부민-EGF/pET28a

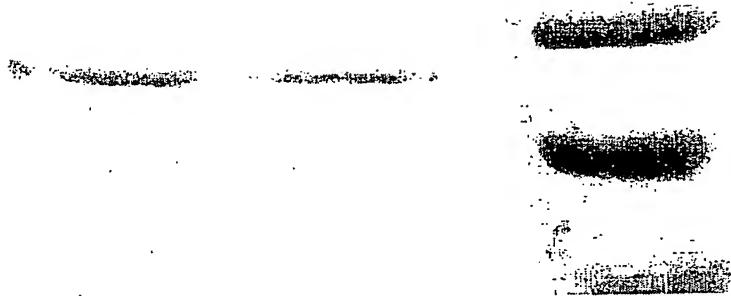
E-A: EGF-알부민/pET28a

【도 5】

E-A

A-E

M



M: Protein size marker

A-E: 알부민 -EGF/pET28a

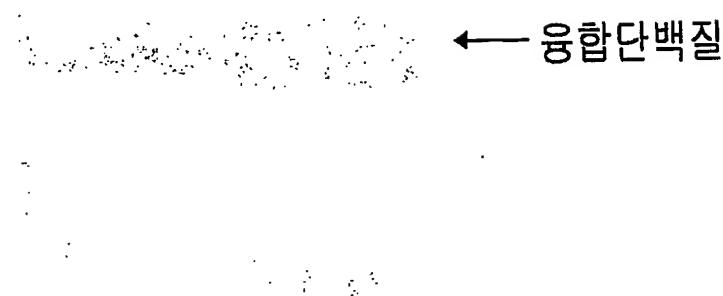
E-A: EGF- 알부민 /pET28a

【도 6】

N

A-E

E-A

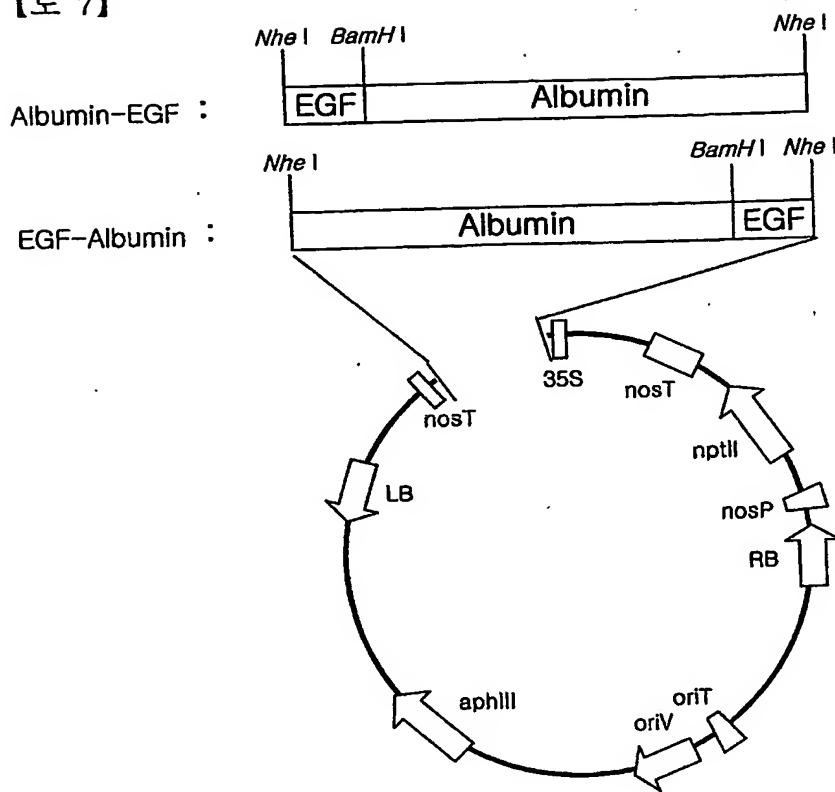


N: pET28a (negative control)

A-E: 알부민 -EGF/pET28a

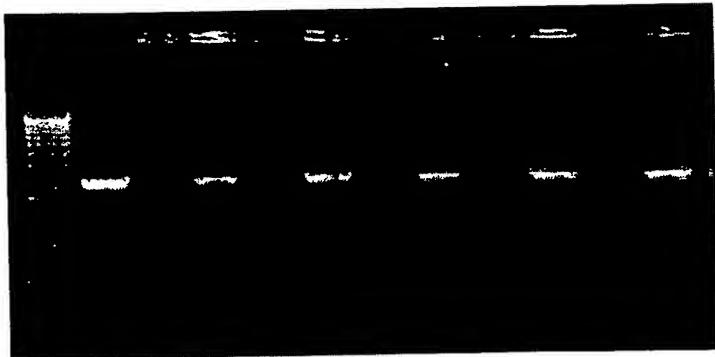
E-A: EGF- 알부민 /pET28a

【도 7】

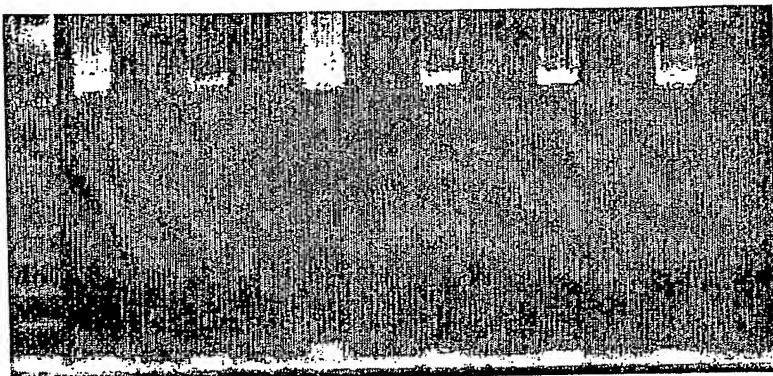


【도 8】

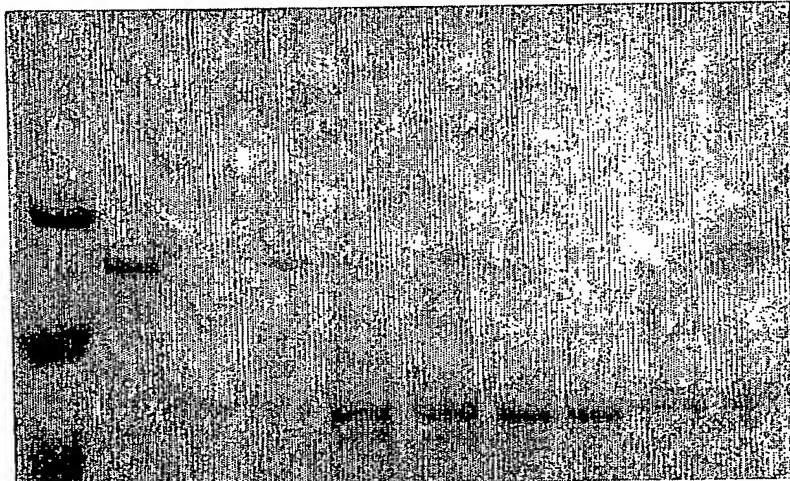
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



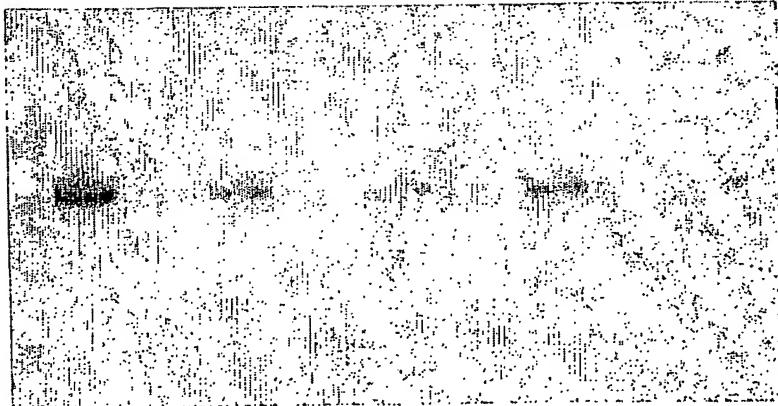
【도 9】



【도 10】



【도 11】



【도 12】
atgaacagcg attcagaatg tccactgagc catgacggat actgcctgca cgacggcgtc
tgcatgtaca tcgaggcact ggacaagtac gcgtgcaact gtgttgttgg atacatcggt
gagcgttgtc aataccgtga tcttaagtgg tggaaactgc gctga